

Нгуен Тхи Туэт, В. Н. Крючков

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА РАЗВИТИЕ ГОНАД АВСТРАЛИЙСКИХ РАКОВ *CHERAX QUADRICARINATUS*

Выращивание однополой культуры десятиногих австралийских раков *Cherax quadricarinatus* – самцов – позволяет получать большую прибыль, чем при обычном товарном выращивании особей обоих полов. Температура является важнейшим фактором, определяющим развитие, рост и размножение ракообразных. Впервые изучалось влияние температуры на созревание гонад австралийских раков на ранних стадиях развития. Были использованы гистологический, морфометрический и статический методы исследования. Показано, что размер женских половых клеток достигает наибольшего значения у раков, выращенных при высокой температуре (30 ± 1 °C). Высокая температура стимулирует развитие гонад самок австралийских раков. Под действием высокой температуры происходит активация транспорта трофических веществ через мембрану клеток. Формирование желтка ооцитов у самок, содержащихся при более высокой температуре, происходит лучше по сравнению с теми раками, которые содержались в других температурных условиях. Гонады самцов были хорошо развиты при оптимальной температуре 27 ± 1 °C. Размер и количество сперматогенных долек гонад у раков, которых содержали при температуре 27 ± 1 °C, оказались больше, чем у представителей «высокотемпературной» и «низкотемпературной» групп.

Ключевые слова: австралийские раки, монополное культивирование самцов, температура, гонады, оогонии, ооциты, семенник, сперматогонии, сперматогенные цисты.

Введение

Австралийский красноклещнёвый рак как объект аквакультуры завоевывает всё большую популярность во многих странах. Этот представитель десятиногих раков обладает отменными потребительскими качествами, доля мяса (30 % от массы тела) превышает аналогичные показатели (15–20 %) длиннопалого рака [1]. Высокий темп роста позволяет ему дорасти до товарной массы всего за три месяца выращивания, что заставило многих производителей отказаться от выращивания местных видов раков.

Достижение половозрелости в большей степени определяется не возрастом, а размером особей. Самки австралийских раков созревают при меньших размерах, чем самцы. Кроме того, самцы характеризуются большим темпом роста [2].

Повышение рентабельности выращивания *Cherax quadricarinatus* может быть достигнуто несколькими способами, один из которых – производство посадочного материала с преобладанием самцов и с их последующим товарным выращиванием. Ранее было показано, что использование однополой культуры самцов при выращивании десятиногих раков позволяет получать большую прибыль, чем при обычном товарном выращивании особей обоих полов [3], т. к. при монополой популяции энергия репродукции направляется в рост, в результате чего увеличиваются размерно-весовые показатели особей [3, 4].

Важнейший фактор жизнеобеспечения гидробионтов – температура. Она является мерой скорости движения молекул, определяет скорость химических реакций, протекающих в живом организме, а также является одним из факторов, ограничивающих рост и метаболизм [5]. У некоторых животных детерминация пола зависит от температуры среды. Например, на формирование пола у черепах влияет температура инкубации, аналогичные процессы происходят и у некоторых рыб и ракообразных. В результате исследований [5, 6] установлено, что популяции с большим количеством самцов у австралийских раков могут быть образованы либо при высокой температуре воды, либо при использовании кормов с добавлением гормона андрогенной железы.

Исследований изменения пола и развития гонад ракообразных под действием температуры немного. Известно, что инверсия пола у десятиногих раков достижима на ранних стадиях, на которых еще не происходит окончательное развитие половой системы. Вследствие этого целью наших исследований являлось изучение влияния температуры на развитие гонад австралийских раков на ранних стадиях развития.

Материал и методы исследования

Экспериментальная часть работы выполнялась на базе малого инновационного предприятия Астраханского государственного технического университета ООО «Эко-тропик» и в лаборатории кафедры «Гидробиология и общая экология». Объектом исследования служили австралийские раки (*Cherax quadricarinatus*) с личиночной стадии до возраста 90 дней. Самки с отложенной на плеоподах икрой и молодь после схода с плеоподов содержались в аквариумах емкостью 150–250 л при разных значениях температуры: 30 ± 1 °C (высокая температура), 27 ± 1 °C (оптимальная температура), 24 ± 1 °C (низкая температура). Кормление молоди раков проводили 2 раза в день – утром и вечером. Постоянная температура поддерживалась терморегуляторами, контроль температуры воды осуществлялся дважды в сутки.

Отбор проб молоди раков проводили в возрасте 60 и 90 дней. Гистологический анализ гонад выполняли в соответствии с общими методиками [7]. Перед фиксацией удаляли хитиновый покров, пробы фиксировали раствором Буэна. Полученные срезы окрашивали гематоксилин-эозином.

Анализ препаратов проводили с использованием микроскопов Olympus BH-2 и Микромед МС-2-Z00М. Измерение половых клеток раков осуществляли с помощью окуляр-микрометра. Определяли диаметр клеток и ядер, рассчитывали ядерно-плазменное отношение [8, 9].

Статистическая обработка полученных результатов исследований осуществлялась при помощи интегральных пакетов STATISTICA v. 6.0 и в среде компьютерной программы Microsoft Excel [10].

Результаты исследований и их обсуждение

В возрасте 60 дней у самок всех опытных и контрольных групп (длина карапакса $13,0 \pm 0,91$ мм, общая длина $30,5 \pm 1,15$ мм) яичники были достаточно хорошо развиты. Вместе с тем половые клетки отличались друг от друга по ряду морфометрических показателей (табл. 1).

Таблица 1

Диаметр яичников и половых клеток равноразмерных самок при разных значениях температуры

Показатель	Опытные группы		
	Высокая температура 30 ± 1 °C	Оптимальная температура 27 ± 1 °C	Низкая температура 24 ± 1 °C
Самки с длиной карапакса 14 мм в возрасте 60 дней			
Длина яичника	$3,15 \pm 0,14$	$2,68 \pm 0,13$	$2,15 \pm 0,16$
Диаметр ооцитов I, мкм*	$42,4 \pm 2,1$	$37,4 \pm 2,47$	$32,9 \pm 1,87$
Диаметр ядер ооцитов I, мкм	$19,7 \pm 1,18$	$17,3 \pm 0,94$	$15,2 \pm 0,8$
Ядерно-плазменное отношение ооцитов I	0,456	0,465	0,471
Самки с длиной карапакса 19 мм в возрасте 90 дней			
Длина яичника	$5,71 \pm 0,78$	$5,15 \pm 0,65$	$4,1 \pm 0,35$
Диаметр ооцитов I, мкм	$69,5 \pm 3,68$	$63,77 \pm 3,24$	$56,67 \pm 2,83$
Диаметр ооцитов II, мкм**	$141,2 \pm 3,58$	$125,7 \pm 3,17$	$111,7 \pm 3,32$
Диаметр ядер ооцитов I, мкм	$28,2 \pm 1,76$	$26,7 \pm 1,4$	$25,04 \pm 1,34$
Диаметр ядер ооцитов II, мкм	$39,4 \pm 2,25$	$36,23 \pm 2,27$	$35,78 \pm 1,54$
Ядерно-плазменное отношение ооцитов I	$0,268 \pm 0,04$	$0,292 \pm 0,03$	$0,258 \pm 0,03$
Ядерно-плазменное отношение ооцитов II	$0,091 \pm 0,02$	$0,113 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,015$

* Ооциты I– ооциты первого порядка (протоплазматического роста).

** Ооциты II– ооциты второго порядка (трофоплазматического роста).

При длине карапакса 14 мм в яичниках раков содержались оогонии и ооциты протоплазматического роста на первой стадии зрелости. Средняя длина яичников у раков, содержащихся при низкой температуре, была достоверно меньше, чем у содержащихся при высокой температуре (2,15 мм) и у самок, содержащихся при температуре, которую принято считать оптимальной для успешного эмбриогенеза (2,1 мм).

Сравнение самок, содержащихся при высокой и оптимальной температуре, показало, что размеры их яичников были почти одинаковыми, однако средний диаметр ооцитов первого порядка у самок «высокотемпературной» группы был немного больше диаметра ооцитов самок «оптимальной» группы. В возрасте 60 дней ядерно-плазменное отношение ооцитов у самок, содержащихся при высокой температуре (0,456), оказалось меньше аналогичного показателя ооцитов самок, содержащихся при оптимальной (0,465) и низкой (0,471) температуре. Как из-

вестно, ядерно-плазменное отношение ооцитов уменьшается в период роста, особенно в период трофоплазматического роста. Таким образом, при повышенной температуре процессы созревания ооцитов ожидаемо происходят быстрее, что находит своё отражение в более быстром уменьшении отношения объёма ядра к объёму клетки. Сравнение показателя ядерно-плазменного отношения у самок, содержащихся при оптимальной и низкой температуре, не выявило достоверных различий. Следовательно, в исследованном температурном диапазоне влияние температуры на ход развития ооцитов проявляется в основном при её верхних значениях.

В возрасте 90 дней (при длине карапакса самок 19,0–19,5 мм) в яичниках присутствовали оогонии, ооциты первого порядка и ооциты начальных фаз периода трофоплазматического роста. Объём яичника увеличивался не столько за счёт увеличения количества клеточных элементов (митотической активности оогониев), сколько за счёт превращения ядер и протоплазмы ооцитов. В этом возрасте происходило отложение трофических веществ (гранул желток) в ооцитах. Размер яичника раков, содержащихся при низкой температуре, был наименьшим ($4,1 \pm 0,35$), и, соответственно, ооциты также были самыми маленькими по сравнению с ооцитами самок других групп. Так, средний диаметр ооцитов первого порядка этой группы составлял 42,78 мкм, что меньше в 1,5 раза, чем у самок, содержащихся при высокой температуре, и меньше диаметра клеток самок, содержащихся при оптимальной температуре, в 1,2 раза. Самый большой размер ооцитов периода трофоплазматического роста был отмечен в «высокотемпературной» группе ($141,2 \pm 3,58$ мкм), что больше размера ооцитов «низкотемпературной» группы на 29,5 мкм. Что касается размеров ядер ооцитов первого и второго порядка, то диаметр ядра увеличивался с повышением температуры воды в диапазоне 24–30 °С. На данной стадии ядерно-плазменное отношение ооцитов первого порядка достигло наибольшего значения – $0,292 \pm 0,03$ у группы самок, содержащихся при оптимальной температуре, хотя довольно близкие значения были у «низкотемпературных» самок. В ооцитах второго порядка значения ядерно-плазменного отношения были ожидаемо меньше. Интересно, что наибольшая разница по ядерно-плазменному отношению между ооцитами первого и второго порядков была у самок рака «высокотемпературной» группы, у которых рассматриваемый показатель уменьшился в 2,95 раза, в то время как у раков из двух других групп – соответственно в 2,54 и 1,98 раза. Судя по этому результату, под действием высокой температуры, не выходящей за пределы толерантности вида, происходит активация транспорта трофических веществ в ооциты. Образование желтка в ооцитах «высокотемпературных» самок происходит гораздо интенсивнее.

Развитие семенников имело следующие особенности. При длине карапакса 13 мм (в возрасте 60 дней) в семеннике можно было видеть цисты со сперматогониями. По форме и размерам сперматогонии сходны с оогониями ювенильных самок рака. Различия в значениях температуры ожидаемо никак не повлияли на величину сперматогониев – их диаметр изменялся в пределах 8,64–8,67 мкм, различия были в пределах статистической ошибки (табл. 2). Сперматогенные дольки у австралийских раков, содержащихся при разных значениях температуры, отличались по размерам. Из табл. 2 видно, что наибольший диаметр был у цист со сперматогониями у особей, содержащихся при оптимальной температуре ($101,3 \pm 4,32$ мкм). При низкой температуре этот показатель ($85,1 \pm 2,38$ мкм) был меньше, чем при высокой ($95,7 \pm 3,43$ мкм).

Таблица 2

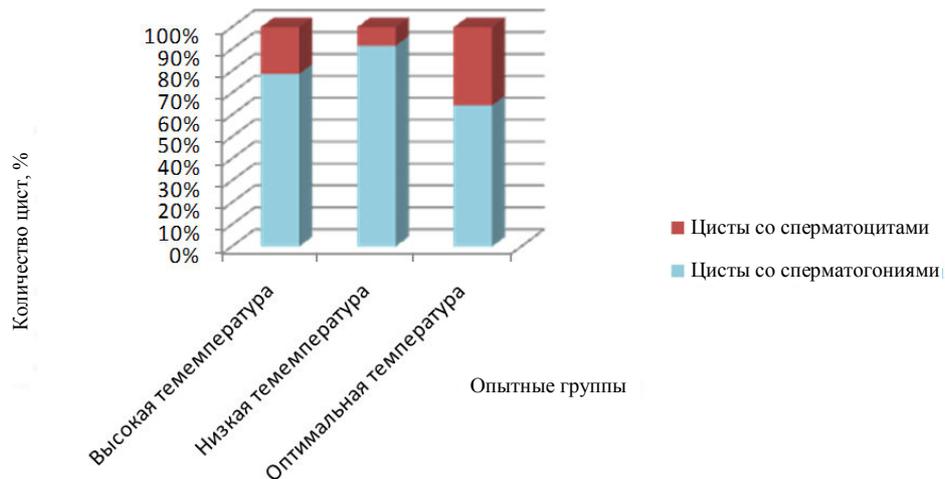
Размер и отношение количества разных долек клеток в семеннике самцов в возрасте 90 дней

Показатель	Опытные группы		
	Высокая температура 30 ± 1 °С	Оптимальная температура 27 ± 1 °С	Низкая температура 24 ± 1 °С
Самцы с длиной карапакса 13 мм в возрасте 60 дней			
Длина семенника, мм	1,27 ± 0,11	1,12 ± 0,08	1,35 ± 0,15
Диаметр сперматогонии, мкм	8,67 ± 0,65	8,62 ± 58	8,64 ± 0,67
Диаметр долек со сперматогониями, мкм	95,7 ± 3,43	85,1 ± 2,38	101,3 ± 4,32
	51,2 – 137,51	49,7 – 98,24	55,1 – 139,6
Самцы с длиной карапакса 18 мм в возрасте 90 дней			
Длина семенника, мм	2,15 ± 0,31	2,01 ± 0,4	2,52 ± 0,45
Диаметр долек со сперматогониями, мкм	102,7 ± 6,58	89,6 ± 5,1	110,4 ± 5,38
	62,3 – 168,4	51,2 – 101,5	83,89 – 195,3
Диаметр долек со сперматоцитами, мкм	110,8 ± 4,9	101,5 ± 5,6	135,6 ± 5,58
	72,11 – 177,8	61,4 – 163,3	91,82 – 183,5

Примечание. Над чертой – среднее значение, под чертой – минимум – максимум.

В возрасте 90 дней при длине карапакса 18,0–18,5 мм в семеннике австралийских раков были отмечены два типа клеток: сперматогонии и сперматоциты. Высокая температура не оказывала воздействия на размеры половых клеток самцов. Средний диаметр сперматогенных долек одноразмерных самцов был наибольшим ($110,4 \pm 5,38$ мкм) при средней (оптимальной) температуре содержания раков. Были выявлены незначительные различия между разными опытными группами по размеру сперматогенных долек.

При оптимальной температуре объем семенника раков увеличивался за счет превращения большего количества сперматогоний в сперматоциты. Количество долек со сперматоцитами в данной группе составило 35,6 %, что больше аналогичного показателя у самцов, содержащихся при высокой температуре, в 1,6 раза и в 4 раза – чем у особей, содержащихся при низкой температуре (рис.).



Количество цист со сперматоцитами и сперматогониями у австралийских раков, содержащихся в разных температурных условиях

Максимальное количество цист со сперматогониями было отмечено в «низкотемпературной» группе – 91,5 %, минимальное – 64,4 % – у самцов, содержащихся при оптимальной температуре.

Заключение

Таким образом, нами установлено, что повышенная температура способствует стимуляции развития гонад у самок австралийских раков. Гонады самцов нормально развиваются при температуре 27 ± 1 °С. Увеличение размеров половых клеток самок при температуре 30 ± 1 °С можно объяснить тем, что под действием высокой температуры во внутриклеточной и межклеточной жидкости может возникнуть сложное конвективное движение, что снимает ограничения диффузного движения жидкости вблизи клеток и, в свою очередь, приводит к более активному переносу веществ через мембраны. Как следствие, под воздействием высокой температуры увеличивается гидратация белковых молекул, что приводит к обводнённости яиц и росту их массы и объема [11]. Подобные эффекты были получены и в экспериментах, описанных в [5, 6]. Кроме того, высокая температура в пределах адаптивных возможностей рака активизирует метаболизм, приводя к ускоренному созреванию яиц, которое сопровождается отложением желтка. Отметим, что механизм влияния температуры на развитие гонады самцов до конца не ясен, т. к. он носит многофакторный (комплексный) характер.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лагуткина Л. Ю. Способ выращивания австралийских раков (*Cherax quadricarinatus*) / Л. Ю. Лагуткина, С. В. Пономарёв // Естественные науки. Журнал фундаментальных и прикладных исследований. 2010. № 4 (33). С. 64–68.
2. Пономарёв С. В. Фермерская аквакультура / С. В. Пономарёв, Л. Ю. Лагуткина, И. Ю. Киреева // М.: ГВЦ Минсельхоза России, 2007. 192 с.

3. Sagi A. The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a biotechnological perspective / A. Sagi, E. D. Aflalo // Aquac. Res. 2005. N 36. P. 231–237.
4. Aflalo E. D. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* / E. D. Aflalo, V. H. Nguyen, Q. Lam, D. M. Nguyen, Q. S. Trinh, S. Raviv, A. Sagi // Aquaculture. 2006. N 256. P. 468–478.
5. De Bock M. S. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae): effect of increasing temperature and androgenic gland extract in the diet / M. S. De Bock, L. S. Lopez Greco // Aquacult. Int. 2010. N 18. P. 231–243.
6. Vazquez F. J. Effect of temperature on sexual differentiation in juveniles of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Astacida, Parastacidae) / F. J. Vazquez, A. Chaulet, A. Bugnot, L. S. Lopez Greco // Proceedings of the III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. 2004. P. 255–259.
7. Салбиев К. Д. Методическое пособие для студентов к практическим занятиям по гистологии (часть I) / К. Д. Салбиев, Л. А. Акоева, Л. С. Таболова и др. Владикавказ: Северо-Осетин. гос. мед. акад., 2008. 115 с.
8. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия / Г. Г. Автандилов. М.: Медицина, 1990. 384 с.
9. Воробьев В. И. Структура дезоксирибонуклеопротеида / В. И. Воробьев // Метаболизм клеточного ядра и ядерно-цитоплазматические отношения. Тез. докл. Киев, 1970. С. 124–125.
10. Бейли И. Н. Статистические методы в биологии / И. Н. Бейли. М.: Иностран. лит., 1962. 260 с.
11. Garcia-Guerrero M. Effect of temperatura on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) / M. Garcia-Guerrero, H. Villarreal, I. S. Racotta // Comp. Biochem. Physiol. Part A. 2003. N 138. P. 147–154.

Статья поступила в редакцию 21.07.2014

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Нгуен Тхи Туэт – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; аспирант кафедры «Гидробиология и общая экология»; ngocha2008@gmail.ru.

Крючков Виктор Николаевич – Россия, 414056, Астрахань; Астраханский государственный технический университет; д-р биол. наук; профессор кафедры «Гидробиология и общая экология»; kvn394@rambler.ru.



Nguyen Thi Tuyet, V. N. Kryuchkov

INFLUENCE OF THE TEMPERATURE ON THE DEVELOPMENT OF THE GONADS OF THE AUSTRALIAN CRAYFISH *CHERAX QUADRICARINATUS*

Abstract. The breeding of the culture of decapod Australian crayfish *Cherax quadricarinatus* – males – helps get more benefit than the common commercial breeding of the species of both sexes. Temperature is a critical determinant of the development, growth and reproduction of crustaceans. It was the first time when the influence of the temperature on the development of the gonads of Australian crayfish at early stages of the development was studied. Histological, morphometric and static methods were used. It was shown that the size of the female reproductive cells of crayfish grown under high temperature (30 ± 1 °C) reaches its highest value. High temperature stimulates the development of the Australian crayfish female gonads. Under the influence of high temperature activation of the transport of trophic substances through the cell membrane takes place. Formation of yolk oocytes of females kept at a higher temperature, proceeds better in comparison with those crayfishes that were contained in other temperature conditions. Male gonads were well developed at an optimum temperature of 27 ± 1 °C. The size and number of spermatogenic lobules of crayfish gonads, which were kept at temperature of 27 ± 1 °C were higher than that of the "high" and "low-temperature" groups.

Key words: Australian crayfish, monosex male culture, temperature, gonads, oogonia, oocytes, testis, spermatogonia, spermatogenic cysts.

REFERENCES

1. Lagutkina L. Iu., Ponomarev S. V. Sposob vyrashchivaniia avstraliiskikh rakov (*Cherax quadricarinatus*) [Method of growing of the Australian crayfish (*Cherax quadricarinatus*)]. *Estestvennye nauki. Zhurnal fundamental'nykh i prikladnykh issledovaniĭ*, 2010, no. 4 (33), pp. 64–68.
2. Ponomarev S. V., Lagutkina L. Iu., Kireeva I. Iu. *Fermerskaia akvakul'tura* [Farmer aquaculture]. Moscow, GVTs Minsel'khoza Rossii, 2007. 192 p.
3. Sagi A., Aflalo E. D. The androgenic gland and monosex culture of freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a biotechnological perspective. *Aquac. Res.*, 2005, no. 36, pp. 231–237.
4. Aflalo E. D., Nguyen V. H., Lam Q., Nguyen D. M., Trinh Q. S., Raviv S., Sagi A. A novel two-step procedure for mass production of all-male populations of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 2006, no. 256, pp. 468–478.
5. De Bock M. S., Lopez Greco L. S. Sex reversal and growth performance in juvenile females of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Parastacidae): effect of increasing temperature and androgenic gland extract in the diet. *Aquacult Int.*, 2010, no. 18, pp. 231–243.
6. Vazquez F. J., Chaulet A., Bugnot A., Lopez Greco L. S. Effect of temperature on sexual differentiation in juveniles of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Astacida, Parastacidae). *Proceedings of the III Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura*, 2004, pp. 255–259.
7. Salbiev K. D., Akoeva L. A., Tabolova L. S. i dr. *Metodicheskoe posobie dlia studentov k prakticheskim zaniatiiam po gistologii (chast' I)* [Handbook for students to practical training in histology (Part I)]. Vladikavkaz, 2008. 115 p.
8. Avtandilov G. G. *Meditssinskaia morfometriia* [Medical morphometric]. Moscow, Meditsina Publ., 1990. 384 p.
9. Vorob'ev V. I. *Struktura dezoksiribonukleoproteida* [Structure deoxyribonucleoproteins]. *Metabolizm kletocnogo iadra i iaderno-tsitoplazmaticheskie otnosheniia. Tezisy dokladov*. Kiev, 1970, pp. 124–125.
10. Beili I. N. *Statisticheskie metody v biologii* [Statistical Methods in Biology]. Moscow, Inostrannaia literatura Publ., 1962. 260 p.
11. Garcia-Guerrero M., Villarreal H., Racotta I. S. Effect of temperatura on lipids, proteins, and carbohydrates levels during development from egg extrusion to juvenile stage of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part A*, 2003, no. 138, pp. 147–154.

The article submitted to the editors 21.07.2014

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nguyen Thi Tuyet – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Postgraduate Student of the Department "Hydrobiology and General Ecology"; kvn394@rambler.ru.

Kryuchkov Victor Nikolaevich – Russia, 414056, Astrakhan; Astrakhan State Technical University; Doctor of Biology, Professor of the Department "Hydrobiology and General Ecology"; kvn394@rambler.ru.

